

新規抗癌剤DL-1-(-Chloropropyl)-2-chloromethylpiperidine Hydrobromideの薬理作用

著者	山田 澄, 越浦 良三, 宮本 謙一, 早苗 富士子
雑誌名	薬学雑誌
巻	100
号	3
ページ	347-354
発行年	1980-03-25
URL	http://hdl.handle.net/2297/7048

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (3) 347-354 (1980)

新規抗癌剤 DL-1-(γ -Chloropropyl)-2-chloromethylpiperidine Hydrobromide の薬理作用

山田 澄,^{1a)} 越浦良三, 宮本謙一, 早苗富士子¹⁾

北陸大学薬学部^{1b)}

Pharmacological Studies on DL-1-(γ -Chloropropyl)-2-chloromethylpiperidine Hydrobromide, a New Antitumor Agent

KIYOSHI YAMADA,^{1a)} RYOZO KOSHIURA, KENICHI MIYAMOTO,
and FUJIKO SANAE¹⁾

Hokuriku University, School of Pharmacy¹⁾

(Received November 2, 1979)

The pharmacological properties of DL-1-(γ -chloropropyl)-2-chloromethylpiperidine hydrobromide (CAP-2), a new nitrogen mustard type antitumor agent, were investigated in various experimental animals. The LD₅₀ value by intraperitoneal single injection of CAP-2 was 60.0 mg/kg for female mice and 65.0 mg/kg for male mice 7 days after injection. Female and male received a maximum tolerated dose of 30 mg/kg and 25 mg/kg, respectively, of CAP-2 intraperitoneally once a day for 7 days. Decrease of spontaneous motilities, mild prolongation of sleeping time, hypothermia, and analgesic action were observed by intraperitoneal injection in mice of a dose of 30 mg/kg of CAP-2, but not at smaller doses. In the isolated large intestine of the guinea pig, a low concentration of CAP-2 caused relaxation and a decrease of activity which was antagonistic for acetylcholine, but not for barium chloride. Intestinal relaxation disappeared and changed to intestinal contraction by the repeated application of CAP-2 (1×10^{-4} g/ml). CAP-2 (1×10^{-4} g/ml) caused intestines relaxed by atropine to contract and increased their activity. This contraction was inhibited by paraverine. In the isolated heart of the frog, CAP-2 showed a negative inotropic action and a concentration of 1×10^{-4} g/ml inhibited the diastolic standstill by acetylcholine. CAP-2 did not affect femoral vessel flow in the frog even at a concentration of 3×10^{-3} g/ml. CAP-2 tended to contract the rectus abdominis muscle of the frog. In the rabbit, CAP-2 (1–5 mg/kg, *i.v.*) exhibited a temporary hypotensive action and weak respiratory stimulation.

From these results, it was confirmed that CAP-2 has a depressant effect on the central nervous system and an anticholinergic action on the periphery.

Keywords—pharmacological actions; DL-1-(γ -chloropropyl)-2-chloromethylpiperidine hydrobromide; central nervous system; depressing action; anticholinergic action; nitrogen mustard; antitumor agent; piperidine

DL-1-(γ -Chloropropyl)-2-chloromethylpiperidine hydrobromide (CAP-2) はさきに山田ら^{2a, b)}によって、抗ヒスタミン作用を持つことが実証された diazabicycloalkane の合成中間体の 1 つであるが、その化学構造が nitrogen mustard 型の化合物である事に着目した越浦ら^{3a-d)}は、各種の bis(haloalkyl)piperidine 誘導体について、種々の可移植性実験動物腫瘍に対する制癌効果を検討し、CAP-2 が最もすぐれた制癌効果を示す化合物である事を報告した。今回、著者らは、CAP-2 の一般薬理作用について検討したので報告する。

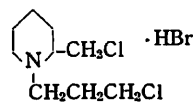


Chart 1

- 1) Location: Kanagawamachi, Kanazawa 920-11, Japan; a) Present address: Motoyamakita-machi 4-7-31, Higashinada-ku, Kobe 658, Japan.
- 2) a) 上坂征夫, 久保信治, 高松八重子, 山田 澄, 田辺玉枝, 山添 寛, 薬誌, 92, 1339 (1972); b) 山田 澄, 山添 寛, 田辺玉枝, 加藤日出男, 木下泰恵, 毛利隆明, 薬誌, 93, 854 (1973).
- 3) a) R. Koshiura, H. Kato, T. Mori, *Jpn. J. Pharmacol.*, 23, 535 (1973); b) S. Fukuda, R. Koshiura, K. Miyamoto, M. Hatano, *Gann*, 68, 175 (1977); c) 宮本謙一, 早苗富士子, 越浦良三, 土屋 隆, 沢西啓之, 指田春喜, 薬誌, 90, 1150 (1977); d) K. Miyamoto, F. Sanae, R. Koshiura, *Gann*, 69, 703 (1978).

実 験 の 部

実験材料

1. 実験動物 実験動物は、体重 20—25 g の ddy 系雄性マウス、体重 2.0—2.5 kg の日本白色種雄性ウサギ、体重 300—350 g の Hartley 系雄性モルモット、および、体重 30—35 g の雄性トノサマカエルをいずれも静岡実験動物農業協同組合より入手して用いた。トノサマカエルを除き、いずれの動物も室温 $24 \pm 1^\circ$ 湿度 $55 \pm 5\%$ の環境にて、一週間の予備飼育を行ったのち、実験に供した。

2. 使用薬物 被験薬 DL-1-(γ -chloropropyl)-2-chloromethylpiperidine hydrobromide (CAP-2) は、当研究室で合成された Chart 1 に示す化学構造式を有し、白色針状晶、または、結晶性粉末であり、mp $123-125^\circ$ で、水に易溶性の化合物である。その他、主な薬物は、chlorpromazine (塩野義)、hexobarbital (帝国化学)、pentobarbital sodium (大日本)、aminopyrine (局方品)、acetylcholine (ACh)、barium chloride (Ba)、atropine sulfate (Atr)、papaverine hydrochloride (Pap) (以上和光より入手) などである。

実験方法

1. 急性毒性 雌雄両性のマウスを、各 6 匹ずつ 10 群とし、公比 1.2 にて生理食塩液に段階希釈された CAP-2 を、腹腔内に投与した。以後 7 日間にわたり、中毒症状、ならびに生死を観察した。死亡例は剖検に付し、生存例については、実験終了後、屠殺、剖検した。LD₅₀ 値は、Litchfield-Wilcoxon 法により、7 日後の死亡動物数より計算された。更に、1 日 1 回、7 日間の連続腹腔内投与による最大耐量も求めた。

2. 溶血作用 CAP-2 を、0.1% の割合に生理食塩液に溶解し、これを 2 倍ずつの低下希釈を行い、その 2 ml にウサギ血液各 1 滴を滴下混和後、 37° の孵卵器中にて 24 時間にわたり、溶血の有無を観察した。

3. 自発運動量におよぼす影響 自発運動量測定装置 (AB Farad, Animex activemeter SEP 型) を用い、1 群 5 匹の雄マウスに CAP-2 を腹腔内投与し、1 時間毎、12 時間にわたって、その累積行動量を記録し、それぞれの投与量について、3 実験の平均で表わした。実験は消灯下、午後 6 時より開始された。

4. 睡眠延長作用 雄マウスを、1 群 5 匹とし、CAP-2 を腹腔内投与 15 分後に、pentobarbital sodium 80 mg/kg、または、hexobarbital 80 mg/kg または、40 mg/kg を腹腔内投与し、正向反射の消失が 30 秒を越したものを睡眠と判定して、睡眠時間を測定し、生理食塩液のみを前投与した対照群のそれと比較した。

5. 体温におよぼす影響 室温 $24 \pm 1^\circ$ において、サーミスター温度計 (夏目, MGA-203 型) を用い、雄マウスの肛門から 2.5 cm の箇所の体温を、15 分間隔で 2 回測定し、 $37.5-38.5^\circ$ に入るものを 1 群 5 匹とし、CAP-2 腹腔内投与後 4 時間、直腸温度を測定した。

6. 鎮痛作用 a) 尾根部加圧法——高木らの方法⁴⁾ に準じて、圧刺激装置 (夏目, KN-205C 型) を用い、雄マウスについて、実験前に正常閾値を 2 回測定し、閾値が $40-80$ mmHg 内に入るマウスのみを選抜し、1 群 5 匹として使用した。CAP-2 を腹腔内投与後、90 分間、15 分間隔で仮性疼痛反応の閾値を測定し、正常閾値を 100 とした場合の相対反応閾値を算出した。

b) 酢酸 writhing 抑制法——Koster の方法⁵⁾ に準じ、1 群 5 匹の雄マウスに CAP-2 を皮下投与し、30 分後に 0.6% 酢酸 (10 mg/kg) を腹腔内投与、その直後から 10 分間毎に示す writhing 数を 90 分間測定し、生理食塩液を投与した対照との比較により、writhing の抑制率を算出した。

c) 熱板法——高木らの方法⁶⁾ に準じ、雄マウスに対して、 $55 \pm 1^\circ$ の熱板上で跳躍および、足底をなめる、仮性疼痛反応を指標として、20 秒以内に反応するマウス 1 群 5 匹に、CAP-2 を腹腔内投与後、90 分間、15 分毎に反応時間を測定し、投与前 2 回の正常閾値と比較した。

7. 摘出腸管におよぼす影響 モルモットを 24 時間絶食した後、撲殺し、大腸条片を摘出し、常法に従って、Tyrode 液を入れた容量 50 ml のマグナス管中に懸垂し、栄養液を 37° に保ち、通気しつつその運動を等張性ヘーベルを介してキモグラフ上に描記した。被験物質は、Tyrode 液に溶解され、栄養液槽に注加された。

8. 摘出心臓におよぼす影響 トノサマカエルの心臓を Straub-Fühner 法により、湿室内に懸垂し、酸素を通じつつ、心運動を等張性ヘーベルを介してキモグラフ上に描記した。被験物質は、Ringer 液に溶解され、カニューレに注加された。なお、実験は、夏期、室温 $24 \pm 1^\circ$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の実験室内で行われた。

9. 血管灌流実験 トノサマカエルを使用し、Läwen-Trendelenberg 法により、後肢血管灌流実験を行った。被験物質は、Ringer 液に溶解され、カニューレ直上のゴム管内に注入された。

10. 骨格筋におよぼす影響 トノサマカエルの腹直筋を摘出し、常法に従い、 $26 \pm 1^\circ$ の Ringer 液を入れた容量 50 ml のマグナス管中に懸垂し、その緊張を等張性ヘーベルを介して、キモグラフ上に描記した。被験物質は、Ringer 液に溶解され、栄養液槽に注加された。

11. 血圧ならびに呼吸におよぼす影響 ウサギを用い、heparine (2000 U/kg, i.v.) により血液凝固を抑制し、urethane 麻酔下、常法により、挿入された動脈カニューレ、ならびに、気管カニューレよりヘーベルを介して、総頸動脈圧、および、呼吸の変化をキモグラフ上に描記した。CAP-2 は、生理食塩液に溶解され、耳静脈内に注

4) 高木敬次郎, 亀山 勉, 矢野烈二, 薬誌, 78, 553 (1958).

5) R. Koster, *Federation Proc.*, 22, 249 (1958).

6) 高木敬次郎, 亀山 勉, 矢野烈二, 薬誌, 77, 871 (1957).

射された。

実験結果は、student's *t*-test または直接確率計算法により統計処理された。

実 験 結 果

1. 急性毒性

CAP-2 をマウスの腹腔内に投与すると、投与直後より中毒症状が発現し 70 mg/kg 以上では、不安状態から 5 分以内に、激しい振せん、次いで間代性痙攣、および、挙尾反応を呈し、歩行失調、時に横臥し、正向反射不全となり、呼吸は深大かつ数の減少をきたし、強直性痙攣を呼び、呼吸麻痺により死亡した。これらの初期の痙攣に耐えた動物においても、その多くは、なお、振せん、首振り運動を残し、外部刺激に過敏となり、3 日以内に痙攣を発し死亡した。生存動物にあっても衰弱が著しく、実験終了後の剖検において、摂餌の形跡は認められなかった。これ以下の投与量では、直後不安状態となるが、中枢興奮症状は現われなかったが、食欲減退し、2 日後より下痢を招き、体重減少、衰弱により亜急性死するものが認められた。Litchfield-Wilcoxon 法による CAP-2 腹腔内投与後 7 日目の LD₅₀ と 95% 信頼限界は、雌マウスに対しては、60.0 (46.9—76.8) mg/kg であり、雄マウスに対しては、65.0 (60.7—69.6) mg/kg であった。一方、7 日間連続投与実験における最大耐量は、雌雄マウスに対して、それぞれ 30 mg/kg, 25 mg/kg であった。この用量において、マウスは投与毎に、直後鎮静状態に陥り、24 時間の行動量も、対照群に比し低下した。また、投与期間中の体重増加も抑制されたが、投与終了後には、外部刺激に過敏になる個体も現われるが、体重の回復は順調であり、7 日後には全て旧状に復帰した。なお、12 mg/kg においては、明らかな影響は何ら認められなかった。

2. 溶血作用

CAP-2 2×10^{-7} — 1×10^{-3} g/ml の濃度について、ウサギ赤血球に対する溶血作用の有無を検討したが、 1×10^{-3} g/ml の濃度にあっても 24 時間にかけて、何ら溶血現象は認められなかった。

3. 自発運動量におよぼす影響

CAP-2 投与マウスは、投与直後鎮静状態となるが、6 mg/kg 以下では、12 時間にわたり、生理食塩液投与対照群と運動量に差はなかった。12 mg/kg 投与群は、4 時間にわたり、行動量は約 50—60% に抑制されたが、以後急速に回復し、12 時間後では、対照群と差は認められなかった。しかし、30 mg/kg 投与群は、8 時間後より若干回復傾向を示したが、12 時間後においても、マウスの行動量は有意 ($p < 0.05$) に抑制された (Fig. 1)。

4. 睡眠延長作用

CAP-2 腹腔内前投与により、マウスの pentobarbital (80 mg/kg, *i.p.*) による睡眠は延長される傾向にあり、30 mg/kg は、47% 延長させたが、hexobarbital (80 mg/kg, *i.p.*) 睡眠には、何ら影響をおよぼさなかった。しかしながら、睡眠の sub-dose の hexobarbital (40 mg/kg, *i.p.*) に対しては、

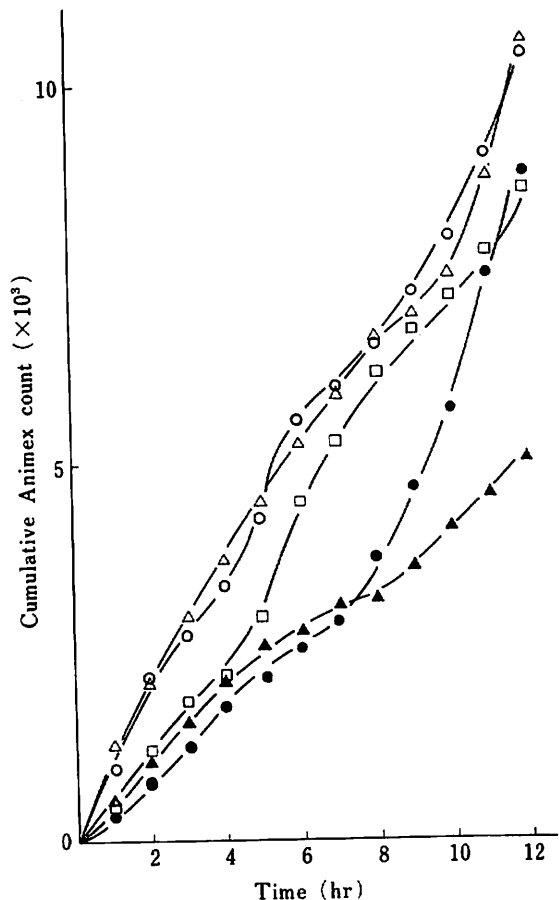


Fig. 1. Effect of CAP-2 on Spontaneous Motor Activity in Mice

Each point represents mean value for 3 experiments.
○—○, control; △—△, CAP-2 6 mg/kg; □—□, CAP-2 12 mg/kg; ▲—▲, CAP-2 30 mg/kg; ●—●, chlorpromazine 5 mg/kg.

TABLE II. Analgesic Activity of CAP-2 in Mice

Agent	Dose (mg/kg)	Relative response ^{a)} (%) mean \pm S.E.	Inhibition ^{b)} (%) mean \pm S.E.	Prolongation ^{c)} (%) mean \pm S.E.
CAP-2	3	131 \pm 16	10.4 \pm 3.7	5.4 \pm 3.7
	6	132 \pm 14	18.2 \pm 7.5	11.8 \pm 5.6
	12	149 \pm 11*	29.2 \pm 9.4	23.6 \pm 11.1
	30	241 \pm 31**	52.0 \pm 10.9*	54.9 \pm 9.4*
Aminopyrine	100	226 \pm 34**	100.0 \pm 0.0**	109.4 \pm 17.5**

a) Tail pressure method, at 30 min after *i.p.* injection.

b) Acetic acid-induced writhing method, from 20 min to 30 min after acetic acid *i.p.* injection.

Agents were injected *s.c.* 30 min before acetic acid.

c) Hot plate method, at 30 min after *i.p.* injection.

Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

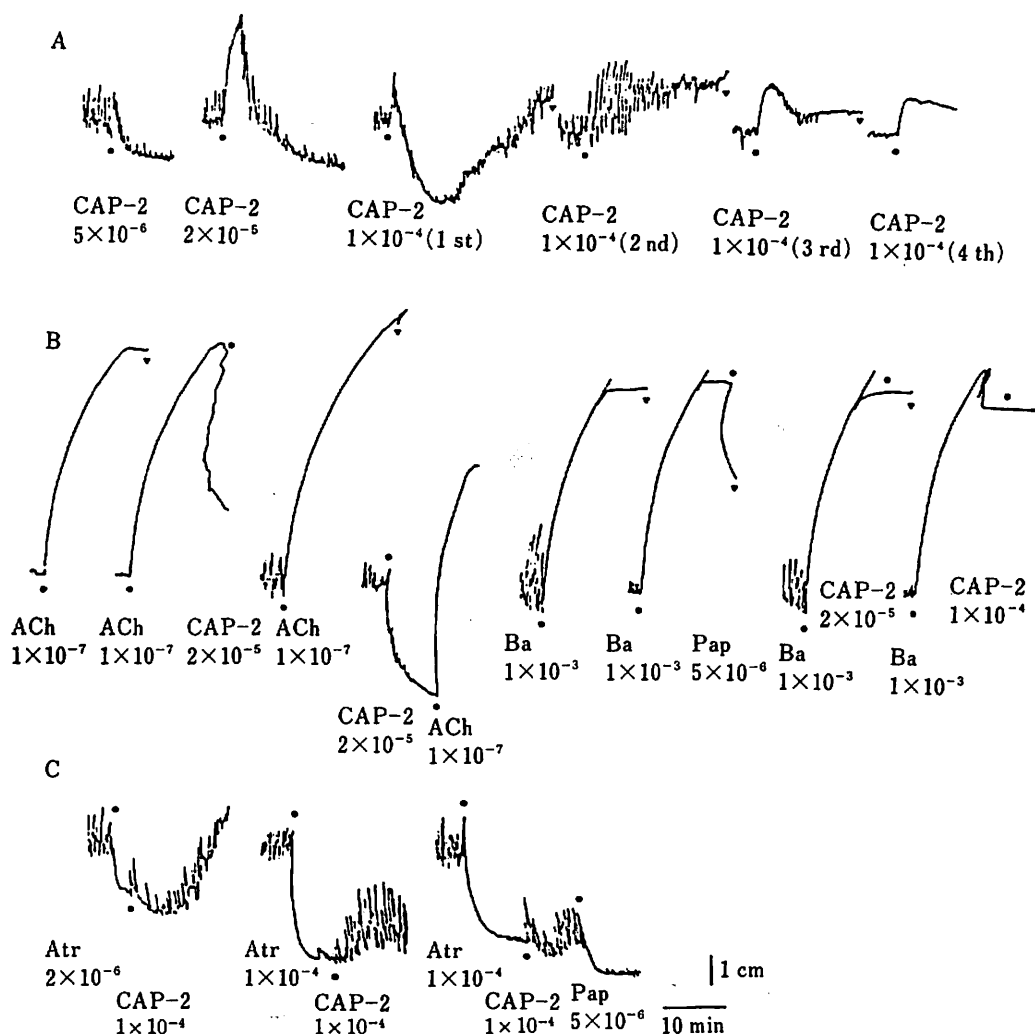


Fig. 3. Effect of CAP-2 on the Isolated Large Intestine of Guinea Pig.

A) Effect of CAP-2 by repeated application. B) Effect of CAP-2 on contraction of acetylcholine (ACh) and barium chloride (Ba). C) Effect of CAP-2 on relaxation of atropine (Atr) and papaverine (Pap). Drugs dosed at dots. ▼, washed at the time following serial experiments.

れた。一方、 $Ba\ 1 \times 10^{-3}$ g/ml による腸管収縮に対しては、 $Pap\ 5 \times 10^{-6}$ g/ml は明らかな収縮緩解放効果を示したが、CAP-2 は、 2×10^{-5} g/ml および 1×10^{-4} g/ml の適用濃度においても、何ら影響をおよぼさなかった (Fig. 3-B)。

次に、Atr より弛緩させた腸管に対する CAP-2 の影響をみた。Atr 2×10^{-6} g/ml を適用して緊張と運動を抑制した大腸に、CAP-2 1×10^{-4} g/ml を作用させると、まず一過性の緊張下降が軽度に見われ、次いで緊張上昇、運動亢進に転じた。更に、Atr 1×10^{-4} g/ml 適用後、CAP-2 1×10^{-4} g/ml を作用させると、運動の著しい亢進を伴う緊張上昇が認められた。これらの現象は、 $Pap\ 5 \times 10^{-6}$ g/ml によって抑制された (Fig. 3-C)。

8. 摘出心臓におよぼす影響

正規の拍動状態のカエル摘出心臓に対し、CAP-2 2×10^{-5} g/ml は無作用であったが、 1×10^{-4} g/ml 以上の濃度では、振幅の縮小をきたし、 2×10^{-3} g/ml を適用すると、収縮は更に小さくなるが拍動数に変化は認められなかった。しかしながら、時に、心運動が著しく障害され、拡張期に停止した。これは正常 Ringer 液で置換することにより正常状態に復帰した (Fig. 4-A)。

一方、ACh 1×10^{-5} g/ml を適用すると、心臓は拡張期に停止するが、CAP-2 1×10^{-4} g/ml および ACh 1×10^{-5} g/ml の混合液を適用すると、心運動の抑制は認められるものの拍動停止には至らなかった (Fig. 4-B)。

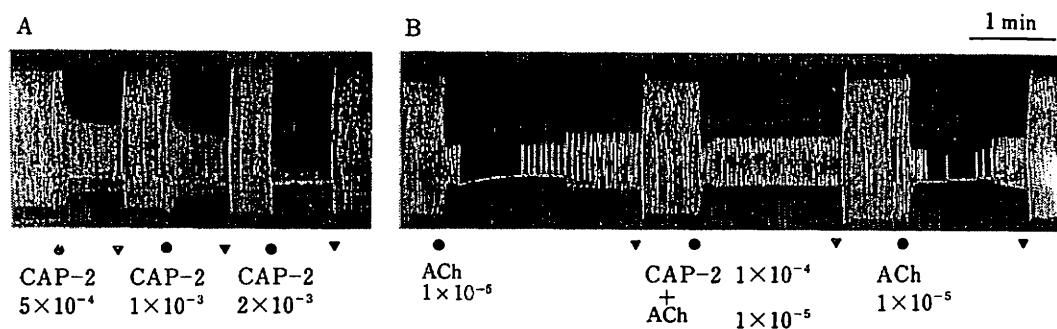


Fig. 4. Effect of CAP-2 on the Isolated Heart of Frog

A) Effect of CAP-2 alone. B) Combined effect of CAP-2 and acetylcholine (ACh).

Drugs dosed at dots. ▽, exchanged the medium at the time following serial experiments.

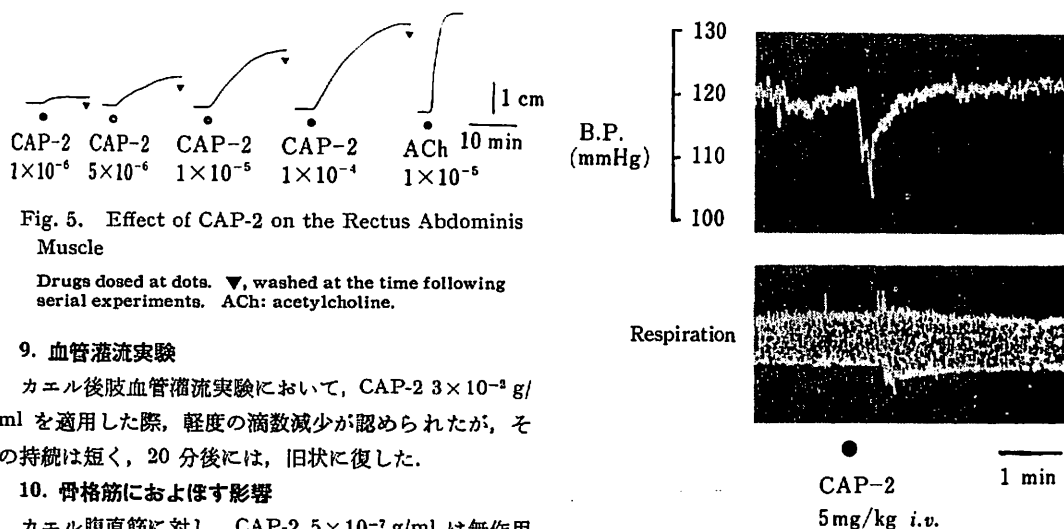


Fig. 5. Effect of CAP-2 on the Rectus Abdominis Muscle

Drugs dosed at dots. ▽, washed at the time following serial experiments. ACh: acetylcholine.

9. 血管灌流実験

カエル後肢血管灌流実験において、CAP-2 3×10^{-3} g/ml を適用した際、軽度の滴数減少が認められたが、その持続は短く、20 分後には、旧状に復した。

10. 骨格筋におよぼす影響

カエル腹直筋に対し、CAP-2 5×10^{-7} g/ml は無作用であったが、 1×10^{-6} g/ml から濃度の増加に伴い、収縮高は大きくなり、 1×10^{-4} g/ml 適用では、ACh 1×10^{-5} g/ml には匹敵する収縮反応を示した (Fig. 5)。

Fig. 6. Effect of CAP-2 on the Blood Pressure and the Respiration in a Rabbit

CAP-2 dosed at dot. B.P.: blood pressure.

11. 血圧ならびに呼吸におよぼす影響

ウサギの耳静脈より CAP-2 を投与したところ、1 mg/kg では何ら影響を認めなかったが、3 mg/kg では投与直後、15 mmHg の血圧下降、それに伴って、軽度の呼吸亢進をきたした。5 mg/kg では、明らかな血圧下降と、呼吸亢進が認められ、それぞれ 1 分および、2 分後に回復した。10 mg/kg に増量すると、30 mmHg 前後におよぶ顕著な血圧下降が起こり、3—4 分で回復したが、呼吸は抑制に転じ、比較的長く持続した。Fig. 6 に、CAP-2 5 mg/kg 静脈内投与時の、血圧、呼吸のキモグラフを示す。

考

察

抗癌剤は、化学構造由来の性質により、強い細胞毒性を示し、制癌効果の他に、少なからず宿主生体の種々の器官に対し、色々な薬理作用を呈することが知られている。^{7a-c)} 本実験に使用した被検薬 CAP-2 は、その構造上、nitrogen mustard 型のアルキル化剤と見なすことが出来、各種の実験動物腫瘍に対して強い制癌効果を示す化合物である^{8a,b)} が、一方、その基本骨格はピペリジンであり、その一般薬理作用を検討したところ、これらの官能部位の個々に起因するもの、または、それらが競合した結果と思われる作用を認めた。

一般中毒症状において、CAP-2 の非常に高投与量においてのみ、著しい中枢興奮症状を観察したが、30 mg/kg で、自発運動量の低下、弱い睡眠増強作用、体温低下作用、鎮痛作用等を認め、むしろ、中枢抑制症状を示した。それ以下の投与量では、見るべき効果をおよぼさなかった。一方、マウスに対して、腹腔内 1 回投与による LD₅₀ 値は雌に対して 60.0 mg/kg 雄に対して 65.0 mg/kg であったが、7 日間連続投与実験における最大耐量は、雌雄マウスに対して、それぞれ、30 mg/kg、25 mg/kg であり、毒性の蓄積は認められず、生体内にて、比較的速やかに代謝、分解を受けるものと考えられる。

摘出腸管に対しては、CAP-2 適用後、一過性の緊張上昇の後、緊張の低下、および、運動抑制がみられる。また、CAP-2 は、acetylcholine の収縮を抑制したが、塩化バリウムの腸管攣縮には何ら影響をおよぼさず、心臓に対しては、acetylcholine による拡張期の停止を阻害する等、CAP-2 の抗コリン効果を示唆した。ここで、CAP-2 適用直後の腸管の一過性の緊張上昇は、ニコチン様作用によるもののようにも見える。しかし、心臓に対しては、negative inotropic action を示すが、心拍数には無影響であり、血圧も上昇しない等、疑問が残る。むしろ、CAP-2 の心臓に対する作用は、腸管に対して高用量でみられた緊張低下の後の緊張上昇、および、運動亢進が、papaverine で抑制されるが、atropine 前処置では影響を受けない事、カエル腹直筋に対する興奮性の作用等を合せ考えると、CAP-2 が、直接心筋に対しては抑制に作用し、平滑筋および、骨格筋に対してはこれを興奮させた結果と考えるのが妥当である。一方、CAP-2 に、交感神経興奮作用を欠くことは、血管灌流実験、心臓および、血圧におよぼす影響から明らかである。CAP-2 は、血圧を一過性に下降させたが、血管系に対する作用が弱い事より、この血圧下降は、主として心臓抑制に基づくものと考えられる。また、これに伴って出現した呼吸亢進は、代償性のものであろう。

Kaseら^{8a,b)} は、ピペリジンについて、その中枢抑制作用、ならびに、末梢においてニコチン様作用を有する事を報告している。更に、腹腔内に投与されたピペコリン酸が、中枢においてピペリジンとして作用する、としている。⁹⁾ 本実験において、CAP-2 自身の基本骨格がピペリジンである事、更に、側鎖のアルキルハライドが加水分解、酸化、脱炭酸の過程を経て、ピペリジンに代謝されることが想像されることなどより、CAP-2 の中枢抑制作用は、ピペリジン骨格の寄与によるものと考えられる。しかしながら、末梢において、CAP-2 は、抗コリン効果を示したが、ニコチン様作用は明確ではなかった。

一方、nitrogen mustard 型の構造を有する化合物は、水溶液中で imonium ion 型に移行することにより、cholinergic activity を示すと言われている。ここで、CAP-2 はモルモット腸管において、長時間、または、反

7) a) F.S. Philips, *Pharmacol. Rev.*, 2, 281 (1950); b) 岩田平太郎, 日薬理誌, 52, 73 (1956); c) 塚越 茂, “癌化学療法の基本と臨床,” 古江 尚, 太田和雄, 田口鉄男, 藤田 浩, 塚越 茂編, 癌と化学療法, 東京, 1978, pp. 37—43.

8) a) Y. Kase, T. Miyata, T. Yuizono, *Jpn. J. Pharmacol.*, 17, 475 (1967); b) Y. Kase, T. Miyata, Y. Kamikawa, M. Kataoka, *Jpn. J. Pharmacol.*, 19, 300 (1969).

9) Y. Kase, Y. Okano, T. Miyata, M. Kataoka, N. Yonehara, *Life Sci.*, 14, 785 (1974).

復適用をすることで、緊張上昇と、運動亢進が認められ、同様の機作が考えられたが、atropine 前処置において、これが抑制されなかったことより否定できる。従って、CAP-2 は、ピペリジン骨格を有するため、ピペリジンとしての作用に加えて、他の nitrogen mustard 型の化合物の如く、コリン様構造を取ることで、抗コリン作用をも示したものと考えられる。

TABLE I. Effect of CAP-2 on Hypnosis by Two Hypnotics in Mice

Agent	Dose (mg/kg, i. p.)	Pentobarbital (80 mg/kg, i. p.) Sleeping time	Hexobarbital (80 mg/kg, i. p.) Sleeping time	Hexobarbital (40 mg/kg, i. p.) ^{a)} Positive ^{b)} / test mice
		mean \pm S.E.	mean \pm S.E.	
Control	—	58.6 \pm 4.91	42.3 \pm 2.90	0/5
CAP-2	6	71.0 \pm 12.10	48.3 \pm 3.98	0/5
	12	84.0 \pm 7.59	47.3 \pm 2.20	0/5
	30	97.7 \pm 14.63	47.9 \pm 2.16	4/5
	5	—	94.9 \pm 5.26**	5/5*
Chlorpromazine	1	86.0 \pm 4.14*	46.0 \pm 3.85	2/5
	5	—	94.9 \pm 5.26**	5/5*

a) Subdose in loss of righting reflex.

b) Mice lost righting reflex for over 30 min.

Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

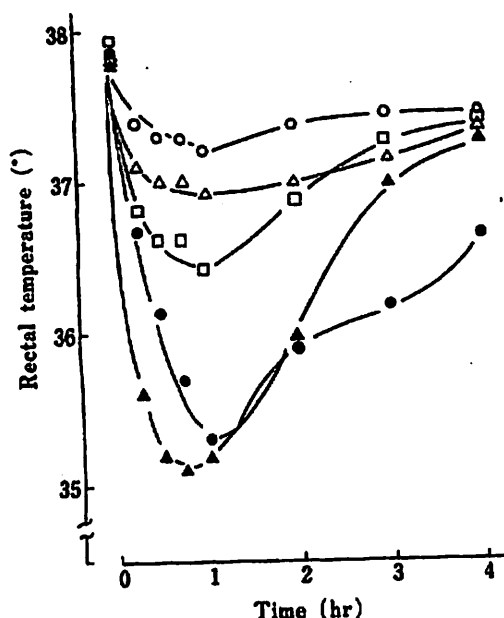


Fig. 2. Effect of CAP-2 on Rectal Temperature in Mice

Each point represents mean value for 5 animals.
 ○—○, control; △—△, CAP-2 6 mg/kg;
 □—□, CAP-2 12 mg/kg; ▲—▲, CAP-2 30 mg/kg;
 ●—●, chlorpromazine 5 mg/kg.

が 2×10^{-6} g/ml では、適用直後、一過性の緊張上昇がみられることがあり、これに引き続いて、緊張低下と運動抑制をきたした。 1×10^{-6} g/ml では、軽度の緊張上昇に続いて著しい緊張下降と運動抑制が現われ、次いでこれは緊張上昇に移行した。更に、この腸管を正常 Tyrode 液で洗浄し、緊張を回復させた後、再度 CAP-2 1×10^{-6} g/ml を作用させると、直ちに著しい運動亢進に伴い、緊張もまた上昇した。更に洗浄、適用を繰返すと、適用後、緊張上昇のみが現われ、これに伴って運動抑制が認められた (Fig. 8-A)。

そこでまず、本物質による緊張低下作用について、ACh および Ba による収縮に対する影響を検討した。ACh の最大収縮高の約 80% の収縮を起こす濃度 1×10^{-7} g/ml の適用による大腸の収縮に対し、CAP-2 2×10^{-6} g/ml は、その収縮高を約 50% 低下させた。また、CAP-2 2×10^{-6} g/ml を作用させて弛緩した大腸に、引き続き ACh 1×10^{-7} g/ml を適用した時の収縮高は、ACh 単独適用による収縮高より明らかに低く、拮抗現象が認めら

CAP-2 30 mg/kg 前投与により、5 例中 4 例が睡眠に陥った (Table I)。

5. 体温におよぼす影響

マウスの正常体温に対し、CAP-2 30 mg/kg 腹腔内投与により、直後より 2 時間にわたり体温は有意 ($p < 0.05$) に低下し、45 分後には最低となった。以後回復傾向をたどり 4 時間後には正常に復した。12 mg/kg 以下においても、投与後 1 時間にわたり低下傾向を示したが、有意な変動ではなかった (Fig. 2)。

6. 鎮痛作用

a) 尾根部加圧法 CAP-2 は、マウスの仮性疼痛閾値を上昇させる傾向にあり、30 mg/kg 投与後、30 分で最高に達し、140% の有意な上昇を示したが、以後その作用は減衰した (Table II)。

b) 酢酸 Writhing 抑制法 CAP-2 皮下投与により、マウスの writhing 数は、無処置マウスに比し、容量依存的に減少したが、顕著なものではなかった (Table II)。

c) 熱板法 CAP-2 30 mg/kg のみが仮性疼痛反応を有意に遅延させたが、著しい影響を与えなかった (Table II)。

7. 摘出腸管におよぼす影響

正常摘出モルモット大腸に対して、CAP-2 5×10^{-6} g/ml の適用では、軽微な緊張低下を認めたにすぎなかった

TABLE II. Analgesic Activity of CAP-2 in Mice

Agent	Dose (mg/kg)	Relative response ^{a)} (%) mean \pm S.E.	Inhibition ^{b)} (%) mean \pm S.E.	Prolongation ^{c)} (%) mean \pm S.E.
CAP-2	3	131 \pm 16	10.4 \pm 3.7	5.4 \pm 3.7
	6	132 \pm 14	18.2 \pm 7.5	11.8 \pm 5.6
	12	149 \pm 11*	29.2 \pm 9.4	23.6 \pm 11.1
	30	241 \pm 31**	52.0 \pm 10.9*	54.9 \pm 9.4*
Aminopyrine	100	226 \pm 34**	100.0 \pm 0.0**	109.4 \pm 17.5**

a) Tail pressure method, at 30 min after *i.p.* injection.

b) Acetic acid-induced writhing method, from 20 min to 30 min after acetic acid *i.p.* injection.

Agents were injected *s.c.* 30 min before acetic acid.

c) Hot plate method, at 30 min after *i.p.* injection.

Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

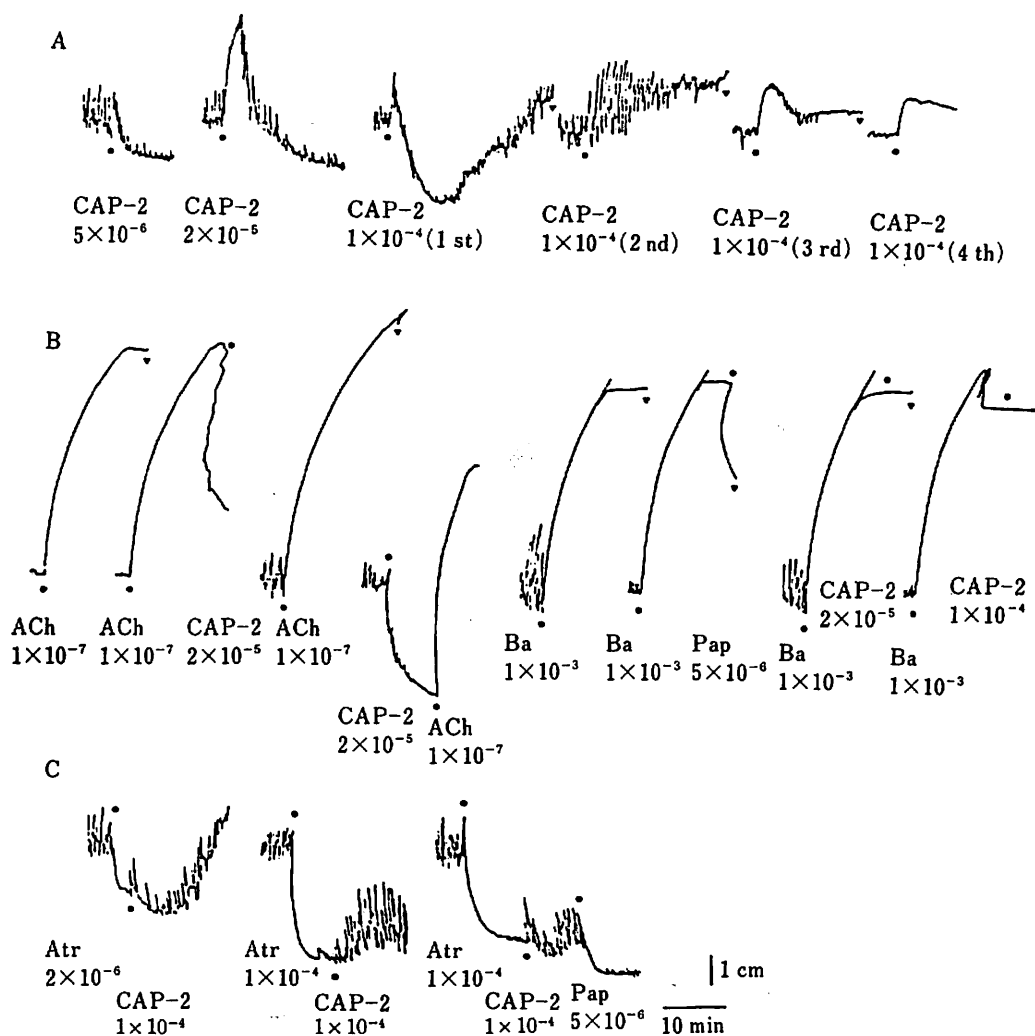


Fig. 3. Effect of CAP-2 on the Isolated Large Intestine of Guinea Pig.

A) Effect of CAP-2 by repeated application. B) Effect of CAP-2 on contraction of acetylcholine (ACh) and barium chloride (Ba). C) Effect of CAP-2 on relaxation of atropine (Atr) and papaverine (Pap). Drugs dosed at dots. ▼, washed at the time following serial experiments.

れた。一方、 $Ba\ 1 \times 10^{-3}$ g/ml による腸管収縮に対しては、 $Pap\ 5 \times 10^{-6}$ g/ml は明らかな収縮緩解効果を示したが、CAP-2 は、 2×10^{-5} g/ml および 1×10^{-4} g/ml の適用濃度においても、何ら影響をおよぼさなかった (Fig. 3-B)。

次に、Atr より弛緩させた腸管に対する CAP-2 の影響をみた。Atr 2×10^{-6} g/ml を適用して緊張と運動を抑制した大腸に、CAP-2 1×10^{-4} g/ml を作用させると、まず一過性の緊張下降が軽度に見われ、次いで緊張上昇、運動亢進に転じた。更に、Atr 1×10^{-4} g/ml 適用後、CAP-2 1×10^{-4} g/ml を作用させると、運動の著しい亢進を伴う緊張上昇が認められた。これらの現象は、 $Pap\ 5 \times 10^{-6}$ g/ml によって抑制された (Fig. 3-C)。

8. 摘出心臓におよぼす影響

正規の拍動状態のカエル摘出心臓に対し、CAP-2 2×10^{-5} g/ml は無作用であったが、 1×10^{-4} g/ml 以上の濃度では、振幅の縮小をきたし、 2×10^{-3} g/ml を適用すると、収縮は更に小さくなるが拍動数に変化は認められなかった。しかしながら、時に、心運動が著しく障害され、拡張期に停止した。これは正常 Ringer 液で置換することにより正常状態に復帰した (Fig. 4-A)。

一方、ACh 1×10^{-5} g/ml を適用すると、心臓は拡張期に停止するが、CAP-2 1×10^{-4} g/ml および ACh 1×10^{-5} g/ml の混合液を適用すると、心運動の抑制は認められるものの拍動停止には至らなかった (Fig. 4-B)。

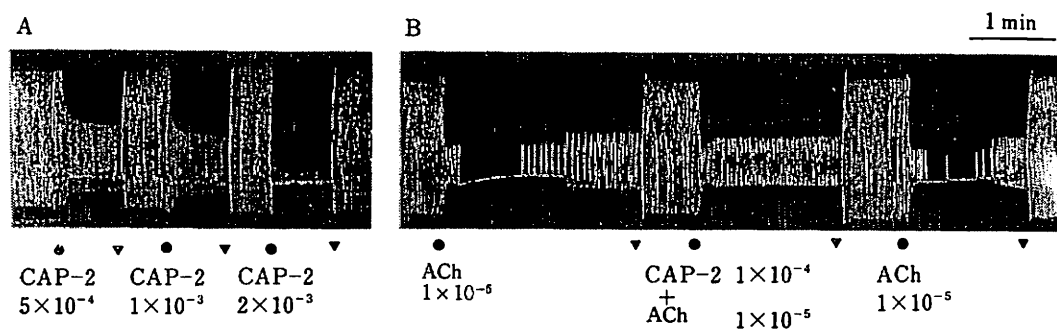


Fig. 4. Effect of CAP-2 on the Isolated Heart of Frog

A) Effect of CAP-2 alone. B) Combined effect of CAP-2 and acetylcholine (ACh).

Drugs dosed at dots. ▽, exchanged the medium at the time following serial experiments.

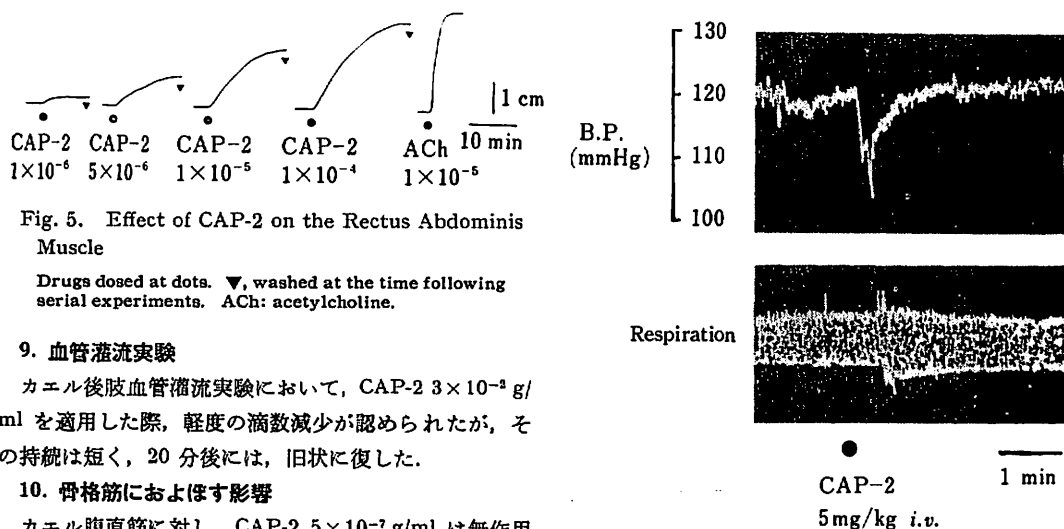


Fig. 5. Effect of CAP-2 on the Rectus Abdominis Muscle

Drugs dosed at dots. ▽, washed at the time following serial experiments. ACh: acetylcholine.

9. 血管灌流実験

カエル後肢血管灌流実験において、CAP-2 3×10^{-3} g/ml を適用した際、軽度の滴数減少が認められたが、その持続は短く、20 分後には、旧状に復した。

10. 骨格筋におよぼす影響

カエル腹直筋に対し、CAP-2 5×10^{-7} g/ml は無作用であったが、 1×10^{-6} g/ml から濃度の増加に伴い、収縮高は大きくなり、 1×10^{-4} g/ml 適用では、ACh 1×10^{-5} g/ml には匹敵する収縮反応を示した (Fig. 5)。

Fig. 6. Effect of CAP-2 on the Blood Pressure and the Respiration in a Rabbit

CAP-2 dosed at dot. B.P.: blood pressure.

11. 血圧ならびに呼吸におよぼす影響

ウサギの耳静脈より CAP-2 を投与したところ、1 mg/kg では何ら影響を認めなかったが、3 mg/kg では投与直後、15 mmHg の血圧下降、それに伴って、軽度の呼吸亢進をきたした。5 mg/kg では、明らかな血圧下降と、呼吸亢進が認められ、それぞれ 1 分および、2 分後に回復した。10 mg/kg に増量すると、30 mmHg 前後におよぶ顕著な血圧下降が起こり、3—4 分で回復したが、呼吸は抑制に転じ、比較的長く持続した。Fig. 6 に、CAP-2 5 mg/kg 静脈内投与時の、血圧、呼吸のキモグラフを示す。

考

察

抗癌剤は、化学構造由来の性質により、強い細胞毒性を示し、制癌効果の他に、少なからず宿主生体の種々の器官に対し、色々な薬理作用を呈することが知られている。^{7a-c)} 本実験に使用した被検薬 CAP-2 は、その構造上、nitrogen mustard 型のアルキル化剤と見なすことが出来、各種の実験動物腫瘍に対して強い制癌効果を示す化合物である^{8a,b)} が、一方、その基本骨格はビペリジンであり、その一般薬理作用を検討したところ、これらの官能部位の個々に起因するもの、または、それらが競合した結果と思われる作用を認めた。

一般中毒症状において、CAP-2 の非常に高投与量においてのみ、著しい中枢興奮症状を観察したが、30 mg/kg で、自発運動量の低下、弱い睡眠増強作用、体温低下作用、鎮痛作用等を認め、むしろ、中枢抑制症状を示した。それ以下の投与量では、見るべき効果をおよぼさなかった。一方、マウスに対して、腹腔内 1 回投与による LD₅₀ 値は雌に対して 60.0 mg/kg 雄に対して 65.0 mg/kg であったが、7 日間連続投与実験における最大耐量は、雌雄マウスに対して、それぞれ、30 mg/kg、25 mg/kg であり、毒性の蓄積は認められず、生体内にて、比較的速やかに代謝、分解を受けるものと考えられる。

摘出腸管に対しては、CAP-2 適用後、一過性の緊張上昇の後、緊張の低下、および、運動抑制がみられる。また、CAP-2 は、acetylcholine の収縮を抑制したが、塩化バリウムの腸管攣縮には何ら影響をおよぼさず、心臓に対しては、acetylcholine による拡張期の停止を阻害する等、CAP-2 の抗コリン効果を示唆した。ここで、CAP-2 適用直後の腸管の一過性の緊張上昇は、ニコチン様作用によるもののようにも見える。しかし、心臓に対しては、negative inotropic action を示すが、心拍数には無影響であり、血圧も上昇しない等、疑問が残る。むしろ、CAP-2 の心臓に対する作用は、腸管に対して高用量でみられた緊張低下の後の緊張上昇、および、運動亢進が、papaverine で抑制されるが、atropine 前処置では影響を受けない事、カエル腹直筋に対する興奮性の作用等を合せ考えると、CAP-2 が、直接心筋に対しては抑制に作用し、平滑筋および、骨格筋に対してはこれを興奮させた結果と考えるのが妥当である。一方、CAP-2 に、交感神経興奮作用を欠くことは、血管灌流実験、心臓および、血圧におよぼす影響から明らかである。CAP-2 は、血圧を一過性に下降させたが、血管系に対する作用が弱い事より、この血圧下降は、主として心臓抑制に基づくものと考えられる。また、これに伴って出現した呼吸亢進は、代償性のものであろう。

Kaseら^{8a,b)} は、ビペリジンについて、その中枢抑制作用、ならびに、末梢においてニコチン様作用を有する事を報告している。更に、腹腔内に投与されたビペコリン酸が、中枢においてビペリジンとして作用する、としている。⁹⁾ 本実験において、CAP-2 自身の基本骨格がビペリジンである事、更に、側鎖のアルキルハライドが加水分解、酸化、脱炭酸の過程を経て、ビペリジンに代謝されることが想像されることなどより、CAP-2 の中枢抑制作用は、ビペリジン骨格の寄与によるものと考えられる。しかしながら、末梢において、CAP-2 は、抗コリン効果を示したが、ニコチン様作用は明確ではなかった。

一方、nitrogen mustard 型の構造を有する化合物は、水溶液中で imonium ion 型に移行することにより、cholinergic activity を示すと言われている。ここで、CAP-2 はモルモット腸管において、長時間、または、反

7) a) F.S. Philips, *Pharmacol. Rev.*, 2, 281 (1950); b) 岩田平太郎, 日薬理誌, 52, 73 (1956); c) 塚越 茂, “癌化学療法の基本と臨床,” 古江 尚, 太田和雄, 田口鉄男, 藤田 浩, 塚越 茂編, 癌と化学療法, 東京, 1978, pp. 37—43.

8) a) Y. Kase, T. Miyata, T. Yuizono, *Jpn. J. Pharmacol.*, 17, 475 (1967); b) Y. Kase, T. Miyata, Y. Kamikawa, M. Kataoka, *Jpn. J. Pharmacol.*, 19, 300 (1969).

9) Y. Kase, Y. Okano, T. Miyata, M. Kataoka, N. Yonehara, *Life Sci.*, 14, 785 (1974).

復適用をすることで、緊張上昇と、運動亢進が認められ、同様の機作が考えられたが、atropine 前処置において、これが抑制されなかったことより否定できる。従って、CAP-2 は、ピペリジン骨格を有するため、ピペリジンとしての作用に加えて、他の nitrogen mustard 型の化合物の如く、コリン様構造を取ることで、抗コリン作用をも示したものと考えられる。